

*“Não existem erros.*

*Os acontecimentos que atraímos a nós, por mais desagradáveis que sejam, são  
necessários para aprendermos o que precisamos de aprender.  
Todos os passos que damos são necessários para chegarmos aonde escolhemos chegar.”*

*Richard Bach*

## **Agradecimentos**

Este trabalho estaria incompleto sem uma palavra de reconhecido agradecimento a todos aqueles que, tanto por palavras de estímulo como por úteis e oportunas sugestões, o tornaram possível

Em primeiro lugar, quero expressar o meu grande agradecimento ao meu orientador, o Professor Doutor Manuel Mota, graças a cuja inteligência e entusiasmo pela ciência ganhei grande parte do gosto que hoje nutro por esta área do saber e a quem agradeço o apoio prestado ao longo deste trabalho.

Quero também agradecer a importante e constante ajuda e atenção do professor Alexander Yelshin e do professor José Teixeira.

Por último um muito obrigada à compreensão de familiares, amigos, coralistas sem os quais esta dissertação não teria sido possível. São eles que fazem a diferença, e que todos os dias me ensinam a outra parte da vida.

# Sumário

A filtração de células da fase líquida é uma operação em grande expansão em biotecnologia, na indústria alimentar e de bebidas ou no tratamento de águas residuais. Devido ao aumento da importância económica destas indústrias torna-se necessário interpretar, de forma correcta os dados obtidos de filtrações, principalmente porque, pode influenciar a escolha do método de filtração. É neste contexto que surge o trabalho apresentado de seguida, que tem como objectivo a separação selectiva de microrganismos por filtração anisotrópica.

Sabe-se que é possível construir meios filtrantes anisotrópicos com tortuosidade controlada, usando para o efeito empacotamentos com diferentes proporções de esferas de vidro de distintos diâmetros. Tentaram-se compreender as relações entre a tortuosidade e a difusão ou a eficácia de separação/resolução de misturas de dois microrganismos de forma morfológica diferente: as bactérias *Lactobacillus bulgaricus* e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. As primeiras, como o próprio nome indica, apresentam a forma de bastonete, as últimas são células circulares. Mais tarde realizou-se também a separação de microesferas de poliestireno, para analisar o efeito do volume. Compararam-se os resultados obtidos com partículas de diferente volume e forma com um estudo alcançado com esferas de vidro.

Nos empacotamentos experimentados verificou-se uma eluição com a ordem: microesferas, leveduras e bacilos. Estes resultados vão de acordo com o esperado. Observa-se a divergência entre a retenção das leveduras e a retenção dos bacilos: as células de fermento seguem um comportamento de cromatografia hidrodinâmica (HDC) enquanto os *Lactobacillus bulgaricus* se comportam pela lei de exclusão e têm uma retenção próxima à das partículas de vidro com 4  $\mu\text{m}$  de diâmetro (com densidade 2.5  $\text{g/cm}^3$ ). O retardamento significativo das células lineares pode ser, naturalmente, especulado como sendo devido à interacção dos *Lactobacillus bulgaricus* com a topologia dos poros. As microesferas sofrem separação de acordo com o princípio de HDC e são separadas com base no seu tamanho. Observam-se comportamentos completamente diferentes e que podem ser descritos pelo modelo de cromatografia hidrodinâmica entre leveduras ( $d = 4.6 \mu\text{m}$ ) e esferas de vidro de 4  $\mu\text{m}$ , mas a densidade das primeiras é cerca de 2.5 vezes inferior à das esferas de vidro.

Testou-se um empacotamento binário com fracção volúmica de partículas esféricas de maior dimensão 0.7, um empacotamento com as partículas de maior dimensão e outro com partículas de menor dimensão desse leito binário. Comparando os empacotamentos conclui-se que a separação é melhorada pela aplicação de um empacotamento binário. É este o que apresenta maior selectividade às partículas testadas, e permite obter picos mais definidos. No fundo, o empacotamento binário oferece maior resistência, o que o torna, para o objectivo proposto, o mais interessante e, conseqüentemente, mais importante a nível industrial.

# Abstract

Liquid phase cell filtration is an expanding process in biotechnology, in the food and beverage industry or wastewater treatment. Due to the increasing economical importance of those industries it becomes necessary to interpret, in a correct way, the data filtration, mainly because it may influence the choice of the filtration method. In this context the work that is presented here was created with the purpose the selective separation of microorganisms by the process of anisotropic filtration.

It is known that is possible to build anisotropic porous media with controlled tortuosity, using for the desired effect, packages with different proportions of glass spheres of different diameters. It has been attempted to understand the relationships between the tortuosity and the diffusion or the effectiveness of separation/resolution of mixtures of two microorganisms in a different morphologic way: the bacteria *Lactobacillus bulgaricus* and the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*. The former ones are rod-shaped, whereas the latter ones are circular cells. Later on the separation of microspheres of polystyrene has also been performed, to analyze the effect of the particles volume. The observed results were compared with particles of different volume and shape with the help of glass spheres.

In the experimented packages, an elution was observed according to the order: microspheres, yeasts and bacilli. These results are in agreement with the expectations. A deviation is seen between the yeasts and the bacilli retention: yeast cells are separated according to hydrodynamic chromatography (HDC) whereas *Lactobacillus bulgaricus* behave is separated according to the exclusion law and has a retention similar to the one of the glass particles with 4  $\mu\text{m}$  diameter (with density 2.5  $\text{g}/\text{cm}^3$ ). The significant retardation of the rod-like cells might be attributed to the interaction of the *Lactobacillus bulgaricus* with the pores topology. The microspheres withstand a separation according to the principle of HDC and are separated according to their size. Completely different behaviours are observed, that can be described by the model of hydrodynamic chromatography between yeasts ( $d = 4.6 \mu\text{m}$ ) and glass spheres of 4  $\mu\text{m}$ , but the density of the first ones is about 2.5 times less to the one of the glass spheres.

A binary package was tested using 0.7 volume fraction of larger spherical particles, a package with the particles of larger dimension and other one with particles of smaller dimension of the first binary bed. Comparing the packings it can be concluded that the separation is improved by the application of binary packing. It is this packing that presents the largest selectivity of the tested particles, and leads to better-defined peaks. In the end, the binary packing offers also a larger resistance that makes it, for the proposed goal, the most interesting and, therefore, the most important for industrial purposes.

# Índice

1. Introdução .....	1
1.1.Cromatografia de exclusão molecular.....	3
1.2.Cromatografia hidrodinâmica de partículas rígidas.....	7
1.3.Cromatografia <i>slalom</i> .....	12
1.4.Meios porosos – Fundamentos teóricos.....	16
1.4.1.Porosidade.....	18
1.4.2.Tortuosidade.....	21
1.5.Construção de meios porosos.....	26
1.5.1.Tipos de meios porosos usados em cromatografia.....	26
1.5.2. Empacotamento binário com propriedades controladas.....	26
1.5.3. Mistura e empacotamento de misturas.....	30
1.6.Importância do estudo das propriedades dos meios porosos e tortuosidade.....	31
2. Materiais e Métodos .....	33
2.1. Características da coluna.....	33
2.2. Empacotamento, porosidade e tamanho dos poros do leito.....	34
2.2.1.Características do empacotamento binário utilizado.....	37
2.3. Crescimento de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> .....	39
2.4. Crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	41
2.5. Procedimento experimental nos ensaios de filtração com microrganismos e outras partículas.....	42
3. Apresentação e Discussão dos Resultados .....	51
3.1.Resultados obtidos com o empacotamento binário.....	51
3.2. Resultados obtidos com os empacotamentos com partículas de um único tamanho.....	56
3.2.1.Leito formado pelas partículas menores da fracção de tamanho $d = 0.1115$ mm.....	57
3.2.2.Leito formado pelas partículas menores da fracção de tamanho $D = 1.125$ mm.....	58
3.2.3.Análise total dos dados obtidos no empacotamento binário e nos empacotamentos com partículas do mesmo tamanho.....	61
3.3.Análise de dados obtidos pelo fluxo de partículas de vidro através de poros com partículas do mesmo tamanho.....	78
4. Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros.....	85
5. Bibliografia .....	87

## APÊNDICES

Apêndice A: Caracterização morfológica da flora do iogurte.....	i
Apêndice B: Preparação dos meios de cultura e do tampão PBS.....	v
Apêndice C: Técnicas de microbiologia.....	vi
Apêndice D: Determinação da concentração celular pelo método da contagem por turbidimetria.....	vii
Apêndice E: Exemplificação de cálculos.....	viii
Apêndice F: Observações experimentais .....	xiv

# Lista de Figuras

Fig. 1.1.1.	Princípio da Cromatografia de Exclusão Molecular	4
Fig. 1.1.2a.	Representação esquemática da dependência do peso molecular dos solutos $MW$ com o tempo de retenção, onde $V_0$ é o volume de espaços vazios e $V_t$ é o volume total da coluna.	5
Fig. 1.1.2b.	Exemplo da relação linear entre o logaritmo do peso molecular para proteínas <i>standard</i> e o tempo de retenção. Nesta experiência usou-se uma coluna I-125 com uma fase móvel que consistia em tampão fosfato de sódio 0,08 M (pH 7.0) contendo 0.32 M de cloreto de sódio e 20% (v/v) etanol. Caudal, 1 mL/min.	5
Fig. 1.1.3.	Gráfico do tamanho de vírus <i>versus</i> posição do pico de retenção, numa coluna com 30 mL de espaços vazios.	6
Fig. 1.1.4.	Intervalo de fraccionamento das matrizes na SEC <i>versus</i> diâmetro do poro, segundo Deutscher <i>et al.</i> . As linhas oblíquas traduzem o limite superior e inferior de fraccionamento.	6
Fig. 1.2.1.	Esboço da separação na cromatografia hidrodinâmica num leito granular e num capilar cilíndrico.	7
Fig. 1.2.2.	Princípio de separação da HDC, onde uma partícula com raio efectivo $r_{eff}$ é excluída da parede num canal com diâmetro $h$ no qual um perfil de velocidade parabólico $u(y)$ é aplicado originando uma velocidade máxima.	10
Fig. 1.3.1.	Princípio da cromatografia <i>slalom</i> .	13
Fig. 1.3.2a.	Cromatograma para a HSA, 1, BSA, 2 e CSA, 3, no caso em que $F = 0.06$ mL/min e a viscosidade da fase móvel $\mu = 1.17$ ,	14
Fig. 1.3.2b.	Curva de $F_c$ <i>versus</i> viscosidade para a proteína HSA	14
Fig. 1.4.1.	Porosidade. Os espaços em branco entre as partículas esféricas constituem os espaços vazios.	18
Fig. 1.4.2.	Representação da Equação 1.4.5 e 1.4.6 para $\varepsilon_d^0$ e $\varepsilon_D^0$ iguais a 0.4, em que o tracejado representa o ramo esquerdo e a linha cheia traduz o ramo direito.	20
Fig. 1.4.3.	Trajectórias com o mesmo comprimento $L$ e $L_e$ e diferente número de curvaturas.	22
Fig. 1.4.4.	Meios porosos, preferencialmente, não devem ser super tortuosos mas super dobrados na maior escala do comprimento da macromolécula.	24
Fig. 1.4.5.	Canais dos poros.	24
Fig. 1.5.1.	Tortuosidade experimental (círculos) <i>versus</i> fracção volúmica de partículas esféricas de maior dimensão, $x_D$ , para uma mistura binária com $D/d = 10.22$ [50]. 1 – tortuosidade calculada pela função $\tau \approx 1/\varepsilon^{0.4}$ ; 2 – tortuosidade calculada pela função polinomial $\tau = 1.47157 + 0.16565x_D - 0.093301x_D^2 + 3.14422x_D^3 - 2.62552x_D^4$ .	27
Fig. 1.5.2.	Permeabilidade, $k$ , <i>versus</i> a fracção volúmica de partículas esféricas de maior dimensão, $x_D$ . Dados experimentais (pontos) e cálculos pelo modelo proposto, Equação 1.5.3. e $\tau \approx 1/\varepsilon^{0.4}$ . 1 – $D/d = 10.22$ , 2 – $D/d = 6.37$ , 3 – $D/d = 3.33$ .	28
Fig. 1.5.3.	Função $(\varepsilon/\tau)^2$ <i>versus</i> $x_D$ para as curvas 1 – $D/d = 1.985$ ; 2 – $D/d = 3.33$ , 3 – $D/d = 6.37$ ; 4 – $D/d = 10.22$ e 5 – $D/d \rightarrow \alpha$ . As curvas a traçado correspondem $\tau = 1.45$ .	29
Fig. 1.6.1.	Transporte e destino de partículas coloidais em meios porosos saturados	31
Fig. 2.1.1.	Esquema da instalação experimental para realização de ensaios de separação de microrganismos e respectiva legenda.	33
Fig. 2.2.1.	Instalação experimental durante um ensaio de determinação da porosidade com uma solução de azul dextrano.	36
Fig. 2.2.2.	Dependência dos dados experimentais (círculo) e previstos (curva) da porosidade $\varepsilon$ do empacotamento binário com a fracção volúmica de partículas esféricas de	38

	maior dimensão, $x_D$ . A curva foi determinada pela Equação 1.5.3 para $\delta = d/D = 0.1$ e $\varepsilon_0 = 0.383$ .	
<b>Fig. 2.2.3.</b>	Variação dos dados experimentais (círculo) e previstos (curva) do tamanho dos poros do empacotamento, $d_{pav}$ , com a fracção volumica de partículas esféricas de maior dimensão, $x_D$ . $d_{pav}$ foi estimado pela Equação 1.5.2., sendo $\delta = d/D = 0.1$ e $\varepsilon_0 = 0.383$ .	38
<b>Fig. 2.2.4.</b>	Dependência da permeabilidade $k$ com a fracção volumica de partículas esféricas de maior dimensão, $x_D$ , para diferentes razões de partículas $D/d$ , baseada no modelo da Equação 1.5.1. O círculo corresponde à situação experimental em que $\delta = d/D = 0.1$ e $\varepsilon_0 = 0.383$ . Nas diferentes curvas, por simplicidade, a porosidade $\varepsilon_0 = 0.4$ foi assumida em todas as funções de 1 a 5.	39
<b>Fig. 2.3.1.</b>	Imagem de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , corados com violeta cristal, captada com uma objectiva de 40 PHACO 2 no microscópio Leitz do Laboratório de Imagem do DEB.	40
<b>Fig. 2.4.1.</b>	Imagem de <i>S. cerevisiae</i> , coradas com violeta cristal, captada com uma objectiva de 40 PHACO 2 no microscópio Leitz do Laboratório de Imagem do DEB.	41
<b>Fig. 2.5.1.</b>	Esquema do procedimento experimental realizado nos ensaios de filtração da PARTE I.	43
<b>Fig. 2.5.2.</b>	Esquema do procedimento experimental realizado nos ensaios de filtração da PARTE II.	45
<b>Fig. 2.5.3.</b>	Imagem de microesferas de poliestireno verde – fluorescente monodisperso, em solução aquosa diluída, captada com uma objectiva de 40 PHACO 2 no microscópio Leitz do Laboratório de Imagem do DEB.	47
<b>Fig. 2.5.4.</b>	Esquema do tamanho, forma e volume de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e microesferas de poliestireno verde – fluorescente	48
<b>Fig. 3.1.</b>	Gráfico que traduz a variação da concentração de 1 – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (●) e 2 – <i>Lactobacillus bulgaricus</i> (x) ao longo do volume recolhido no ensaio B e C da parte I.	51
<b>Fig. 3.2.</b>	Resultados da separação das partículas: 1 – microesferas com concentração inicial média $C_0 = 10.92$ g/L (○), 2 – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com concentração inicial média $C_0 = 0.358$ g/L (●) e 3 – <i>Lactobacillus bulgaricus</i> com concentração inicial média $C_0 = 0.271$ g/L (x), ao longo do volume $v$ , no empacotamento binário. Os dados estão representados na forma de concentração normalizada $C_N$ que é igual à razão da concentração de um dado ponto com a concentração máxima. As curvas são uma aproximação da distribuição de Gauss.	53
<b>Fig. 3.3a.</b>	Resultados da separação de 1 – azul dextrano com concentração inicial $C_0 = 1.0$ g/L (■) e 2 – <i>Lactobacillus bulgaricus</i> com concentração inicial $C_0 = 0.333$ g/L (x) ao longo do volume $v$ , no empacotamento binário. Os dados estão representados na forma de concentração normalizada $C_N$ . As curvas são aproximações pela distribuição de Gauss.	54
<b>Fig. 3.3b.</b>	Resultados da separação de 1 – microesferas com concentração inicial $C_0 = 10.92$ g/L (○) e 2 – <i>Lactobacillus bulgaricus</i> com concentração inicial $C_0 = 0.208$ g/L (x) ao longo do volume $v$ , no empacotamento binário. Os dados estão representados na forma de concentração normalizada $C_N$ . As curvas são aproximações pela distribuição de Gauss.	54
<b>Fig. 3.4.</b>	Resultados da separação de 1 – microesferas com concentração inicial $C_0 = 10.92$ g/L (○) e 2 – azul dextrano com concentração inicial $C_0 = 1.0$ g/L (■) ao longo do volume $v$ , no empacotamento binário. Os dados estão representados na forma de concentração normalizada $C_N$ . As curvas são aproximações pela distribuição de Gauss.	55

Fig. 3.5.	Resultados da separação de 1 – azul dextrano com concentração inicial $C_0 = 1.5$ g/L (■) e 2 – microesferas com concentração inicial $C_0 = 15.00$ g/L (○) ao longo do volume $v$ , na coluna empacotada com partículas do tamanho 0.1115 mm. Os dados estão representados na forma de concentração normalizada $C_N$ . As curvas são aproximações pela distribuição de Gauss.	57
Fig. 3.6.	Resultados da separação de azul dextrano (■) com concentração inicial $C_0 = 1.0$ g/L ao longo do volume $v$ , na coluna empacotada com partículas do tamanho 1.125 mm. Os dados estão representados na forma de concentração normalizada $C_N$ .	59
Fig. 3.7.	Resultados da separação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (●) com concentração inicial $C_0 = 0.240$ g/L, ao longo do volume $v$ , no empacotamento com partículas do tamanho 1.125 mm. Os dados estão representados na forma de concentração normalizada $C_N$ .	59
Fig. 3.8.	Resultados da separação de microesferas (○) com concentração inicial $C_0 = 0.015$ g/L, ao longo do volume $v$ , no empacotamento com partículas do tamanho 1.125 mm. Os dados estão representados na forma de concentração normalizada $C_N$ .	59
Fig. 3.9.	Resultados da separação de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> (×) com concentração inicial $C_0 = 0.351$ g/L, ao longo do volume $v$ , no empacotamento com partículas do tamanho 1.125 mm. Os dados estão representados na forma de concentração normalizada $C_N$ .	59
Fig. 3.10.	Conjunto de resultados da separação de: 1 – azul dextrano com concentração inicial $C_0 = 1.0$ g/L (●), 2 – microesferas com concentração inicial $C_0 = 0.015$ g/L (○), 3 – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com concentração inicial $C_0 = 0.240$ g/L (●) e 4 – <i>Lactobacillus bulgaricus</i> com concentração inicial $C_0 = 0.351$ g/L (×), ao longo do volume $v$ , na coluna empacotada com partículas do tamanho 1.125 mm. Os dados estão representados na forma de concentração normalizada $C_N$ .	61
Fig. 3.11.	Dependência de $D_e / D_0$ com $\lambda$ . Foram usadas as seguintes equações: 1 – $D_e / D_0 = \exp(-2.0\lambda)$ ; 2 – $\frac{D_e}{D_0} = \frac{\varepsilon}{T_i} \left(1 - \frac{\lambda_m}{2}\right)^2 (1 - 1.0522\lambda + 0.2611\lambda^3 - 0.0296\lambda^5)$ assumindo $\lambda_m = \lambda$ ; 3 – $\frac{D_e}{D_0} = (1 - \lambda)^2$ ; 4 – $D_e / D_0 = \exp(-3.89\lambda)$ ; 5 – $D_e / D_0 = \exp(-4.6\lambda)$ ; 6 – $D_e / D_0 = (1 - \lambda)^2 [1 - 2.1044\lambda + 2.089\lambda^3 - 0.948\lambda^5]$ , com a condição $\lambda \leq 0.5$ ; 7 – $D_e / D_0 = 1 + \frac{9}{8}\lambda \ln(\lambda) - 1.54\lambda$ , assumindo $\lambda \leq 0.1$ ; 8 – $D_e / D_0 = (1 - 1.83\lambda + 4.18\lambda^2) \exp(-6.52\lambda)$ ; 9 – $D_e / D_0 = (1 - \lambda)^2 (1 - 2\lambda + 2\lambda^3 - 0.95\lambda^5)$ .	63
Fig. 3.12.	Dependência de $D_e / D_0$ com $\lambda$ com relevo para a dependência da função da componente de conformação da molécula $F_1(\lambda)$ , equação (4) em $\lambda$ a diferentes modelos similares ao modelo da equação da curva 6. As curvas apresentadas bem como o número e função correspondentes são semelhantes às curvas da Figura 3.11.	64
Fig. 3.13.	Tempo de retenção $\tau$ versus $\lambda$ para os sistemas de empacotamento binário e empacotamento com partículas de menor dimensão. (●) – Microesferas (no leito com partículas de pequena dimensão), (○) – Microesferas (empacotamento binário), (×) – <i>Lactobacillus bulgaricus</i> (empacotamento binário), calculados em duas variantes: razão do diâmetro ou comprimento com o tamanho de poro, (●) – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (empacotamento binário). Curvas: 1 – Modelo de	66



	separação de cromatografia hidrodinâmica, HDC, equação $\tau = 1/(1 + 2\lambda - C\lambda^2)$ , sendo $C = 2.8$ , 2 – Efeito de exclusão, $\tau = 1.2/(1 - \lambda)^2$ , 3 – Efeito de exclusão, $\tau = 1.7/(1 - \lambda)^2$ e 4 – valor de $\lambda$ para partículas de menor dimensão quando todos os bacilos foram retidos no empacotamento.	
Fig. 3.14.	Tempo de retenção $\tau$ versus $\lambda$ para os sistemas de empacotamento binário e empacotamentos com partículas de menor e maior dimensão. (●) – Microesferas (leito com partículas de menor e maior dimensão), (○) – Microesferas (empacotamento binário), (x) – <i>Lactobacillus bulgaricus</i> (empacotamento binário), calculados em duas variantes: razão do diâmetro ou comprimento com o tamanho de poro, (●) – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (empacotamento binário). No caso das leveduras e dos bacilos são os pontos que estão assinalados através de setas que correspondem ao empacotamento de partículas de maior dimensão. Curvas: 1 – $\tau = 1/(1 + 2\lambda - 2.8\lambda^2)$ ; 2 – $\tau = 1.6/(1 + 2\lambda - 2.8\lambda^2)$ ; 3 – $\tau = 1.7/(1 - \lambda)^2$ ; 3' – $\tau = 1.55/(1 - \lambda)^3$ ; 4 – valor de $\lambda$ para partículas de menor dimensão quando todos os bacilos foram retidos no empacotamento.	67
Fig. 3.15.	Macromolécula flexível no canal de um poro, segundo Hoagland <i>et al.</i>	69
Fig. 3.16a.	Tamanho efectivo do xantano conforme a variação da taxa de fluxo. Estes dados podem ser interpretados em termos do modelo de “halteres” rígido, com uma porção de fluxo dependente da curva orientação reflectida no campo de fluxo. O declive da curva neste regime é muito perto do valor teórico de 0.5 para bacilos em alongamento uni – axial fixo.	71
Fig. 3.16b.	Tamanho efectivo de TMV conforme a variação da taxa de fluxo. Uma vez que TMV é uma partícula rígida Considerando que a partícula de TMV é rígida, a dependência de fluxo tem que surgir da orientação no campo de fluxo. A teoria de haltere rígido prediz um declive de 0.5, muito próximo do que é observado.	71
Fig. 3.17.	Tempo de retenção $\tau$ versus razão do tamanho da molécula com o tamanho do poro, $\lambda$ para os sistemas de empacotamento binário e empacotamento com partículas de menor dimensão. (●) – microesferas (coluna com partículas de pequena dimensão), (○) – microesferas (empacotamento binário), (x) – <i>Lactobacillus bulgaricus</i> (empacotamento binário), calculados em duas variantes: razão do diâmetro ou comprimento com o tamanho de poro, (●) – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (empacotamento binário). Curvas: 1 – $\tau = 1/(1 + 2\lambda - 2.8\lambda^2)$ ; 2 – $\tau = 1.6/(1 + 2\lambda - 2.8\lambda^2)$ ; 3 – $\tau = 1.7/(1 - \lambda)^2$ ; 3' – $\tau = 1.55/(1 - \lambda)^3$ ; 4 – valor de $\lambda$ para partículas de menor dimensão quando todos os bacilos foram retidos no empacotamento.	74
Fig. 3.18.	Universalidade da calibração de tamanhos na HDC ( $Rf$ versus raiz quadrada do diâmetro da partícula) para diferentes tipos de partículas.	77
Fig. 3.19.	Filtração de partículas de 4 $\mu\text{m}$ ( $C_0 = 2\text{g/L}$ ) através de um empacotamento com partículas do mesmo tamanho: 1 – 1.125 mm (●); 2 – 0.875 mm (▲); 3 – 0.375 mm (■). Espaços vazios da coluna $V_0 = 550\text{ mL}$ , porosidade $\varepsilon = 0.380$ , $V_{\text{total}}/V_0 = 1/\varepsilon = 2.63$ . Para a situação 1 – $\tau = 1.273$ (1.354), $\lambda = 0.0087$ ; 2 – $\tau = 1.776$ , $\lambda = 0.011$ ; 3 – $\tau = 1.776$ , $\lambda = 0.026$ .	79
Fig. 3.20.	Filtração de partículas de 19 $\mu\text{m}$ ( $C_0 = 2\text{g/L}$ ) através de um empacotamento com partículas do mesmo tamanho: 1 – 1.125 mm (●); 2 – 0.875 mm (▲); 3 – 0.375 mm (■). Espaços vazios da coluna $V_0 = 550\text{ mL}$ , porosidade $\varepsilon = 0.380$ , $V_{\text{total}}/V_0 = 1/\varepsilon = 2.63$ . Para a situação 1 – $\tau = 1.45$ (1.477), $\lambda = 0.041$ ; 2 – $\tau = 1.595$ (1.54), $\lambda = 0.053$ ; 3 – $\tau = 1.774$ (1.72), $\lambda = 0.124$ .	79
Fig. 3.21.	Filtração de partículas de 60 $\mu\text{m}$ ( $C_0 = 2\text{g/L}$ ) através de um empacotamento com partículas do mesmo tamanho: 1 – 1.125 mm (●); 2 – 0.875 mm (▲); 3 – 0.375 mm (■). Espaços vazios da coluna $V_0 = 550\text{ mL}$ , porosidade $\varepsilon = 0.380$ , $V_{\text{total}}/V_0 = 1/\varepsilon = 2.63$ . Para a situação 1 – $\tau = 1.09$ , $\lambda = 0.13$ ; 2 – $\tau = 1.108$ , $\lambda = 0.1677$ ; 3 – $\tau = 1.6$ (~2.6), $\lambda = 0.391$	79

<b>Fig. 3.22.</b>	Filtração de suspensões ( $C_0 = 2\text{g/L}$ ) de tamanhos: 1 – 4 $\mu\text{m}$ (●); 2 – 19 $\mu\text{m}$ (▲); 3 – 60 $\mu\text{m}$ (■) através do empacotamento de partículas de tamanho 1.125 mm. Espaços vazios da coluna $V_0 = 550\text{ mL}$ .	80
<b>Fig. 3.23.</b>	Filtração de suspensões ( $C_0 = 2\text{g/L}$ ) de tamanhos: 1 – 4 $\mu\text{m}$ (●); 2 – 19 $\mu\text{m}$ (▲); 3 – 60 $\mu\text{m}$ (■) através do empacotamento de partículas de tamanho 0.875 mm. Espaços vazios da coluna $V_0 = 550\text{ mL}$ .	80
<b>Fig. 3.24.</b>	Filtração de suspensões ( $C_0 = 2\text{g/L}$ ) de tamanhos: 1 – 4 $\mu\text{m}$ (●); 2 – 19 $\mu\text{m}$ (▲); 3 – 60 $\mu\text{m}$ (■) através do empacotamento de partículas de tamanho 0.375 mm. Espaços vazios da coluna $V_0 = 550\text{ mL}$ .	80
<b>Fig. 3.25.</b>	Esboço de filtração num meio poroso profundo. Possíveis influências da tortuosidade: efeito de inércia, sedimentação, adsorção.	81
<b>Fig. 3.26.</b>	Variação do tempo de retenção $\tau$ com a razão do tamanho da molécula com o tamanho do poro $\lambda$ para partículas de vidro de 4 $\mu\text{m}$ (●); 19 $\mu\text{m}$ (▲) e 60 $\mu\text{m}$ (■), obtida para colunas com empacotamentos de partículas iguais com o tamanho: A – 1.125 mm, B – 0.875 mm, e C – 0.375 mm. Curvas: 1 – $\tau = 1.55/(1-\lambda)^2$ ; 2 – $\tau = 1.35/(1-\lambda)^2$ ; 3 – $\tau = 1/(1-\lambda)$ .	81
<b>Fig. 3.27.</b>	Esquema do poro de diâmetro médio $d_{av}$ com movimento descendente de partículas grandes e pequenas.	82
<b>Fig. 3.28.</b>	Variação do tempo de retenção $\tau$ com a razão do tamanho da molécula com o tamanho do poro $\lambda$ para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (●) e partículas de vidro de 4 $\mu\text{m}$ (●); 19 $\mu\text{m}$ (▲) e 60 $\mu\text{m}$ (■). A seta indica o resultado obtido com o empacotamento binário. Curvas: 1 – $\tau = 1.55/(1-\lambda)^2$ ; 2 – $\tau = 1.35/(1-\lambda)^2$ ; 3 – $\tau = 1/(1-\lambda)$ ; 4 – $\tau = 1.6/(1+2\lambda-2.8\lambda^2)$ .	83
<b>Fig. 3.29.</b>	Variação do tempo de retenção $\tau$ com a razão do tamanho da molécula com o tamanho do poro $\lambda$ para partículas de vidro de 4 $\mu\text{m}$ (●); 19 $\mu\text{m}$ (▲) e 60 $\mu\text{m}$ (■), microesferas (coluna com partículas de pequena dimensão) (●), microesferas (empacotamento binário) (○), <i>Lactobacillus bulgaricus</i> (empacotamento binário) (×), calculados em duas variantes: razão do diâmetro ou comprimento com o tamanho de poro, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (empacotamento binário) (●). Curvas: 1 – $\tau = 1/(1+2\lambda-2.8\lambda^2)$ ; 1' – $\tau = 1.6/(1+2\lambda-2.8\lambda^2)$ ; 2 – $\tau = 1.2/(1-\lambda)^2$ ; 3 – $\tau = 1.7/(1-\lambda)^2$ ; 3' – $\tau = 1.55/(1-\lambda)^3$ ; 4 – valor de $\lambda$ para partículas de menor dimensão quando todos os bacilos foram retidos no empacotamento.	83

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 3.1.</b>	Características da separação das partículas no empacotamento binário: microesferas (○), <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (●) e <i>Lactobacillus bulgaricus</i> (×), retiradas a partir da <b>Figura 3.2.</b> . O tempo de retenção $\tau$ apresenta-se calculado com base na razão do tempo de eluição do pico de concentração da partícula filtrada com o tempo de eluição do marcador azul dextrano. A razão do tamanho da molécula com o tamanho do poro $\lambda$ , no caso dos bacilos, é apresentada para as duas principais dimensões, correspondendo o valor entre parêntesis ao valor de $\lambda$ calculado com o diâmetro destes microrganismos.	54
<b>Tabela 3.2.</b>	Percentagem de partículas que atravessaram a coluna com empacotamento de esferas de menor dimensão (0.1115 mm) com tamanho de poro $d_{por} = 46 \mu\text{m}$ na fase dispersa.	58
<b>Tabela 3.3.</b>	Características da separação das partículas no empacotamento com esferas de dimensão $D$ : microesferas (○), <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (●) e <i>Lactobacillus bulgaricus</i> (×). O tempo de retenção $\tau$ apresenta-se calculado com base na razão do tempo de eluição do pico de concentração da partícula filtrada com o tempo de eluição do marcador azul dextrano. A razão do tamanho da molécula com o tamanho do poro $\lambda$ , no caso dos bacilos, é apresentada para as duas principais dimensões, correspondendo o valor entre parêntesis ao valor de $\lambda$ calculado com o diâmetro destes microrganismos.	60
<b>Tabela 3.4.</b>	Parâmetros moleculares de proteínas “standard”.	75

## Glossário

DEB	Departamento de Engenharia Biológica
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i>
MW	<i>Molecular Weight</i>
HPLC	<i>High – Performance Liquid Chromatography</i>
SC	<i>Slalom Chromatography</i>
HDC	<i>Hydrodynamic Chromatography</i>
UV	Ultra – Violeta
Re	Número de Reynolds

# Nomenclatura

$a$	coeficiente numérico
$A$	coeficiente que depende da forma de partícula
$C$	concentração do polímero (mol/L)
$C_m$	concentração de soluto na fase móvel (mol/L)
$C_s$	concentração de soluto na fase estacionária (mol/L)
$C_\lambda$	constante de ordem um
$D$	diâmetro das partículas de maior dimensão na mistura binária (m)
$d$	diâmetro da fibra ou diâmetro das partículas de menor dimensão na mistura binária (m)
$D_0$	coeficiente de difusividade no seio do meio ( $m^2/s$ )
$d_{av}$	diâmetro médio das partículas (m)
$D_e$	coeficiente de difusividade efectiva ( $m^2/s$ )
$De$	número de Deborah
$d_{ef}$	tamanho efectivo da molécula (m)
$D_i$	coeficiente de difusão da molécula de soluto $i$ na fase móvel ( $m^2/s$ )
$d_{mol}$	tamanho da moléculas (m)
$d_p$	diâmetro da partícula (m)
$d_{pav}$	diâmetro ou tamanho médio dos poros (m)
$d_{pmin}$	tamanho mínimo dos poros (m)
$d_s$	diâmetro equivalente da partícula (m)
$E$	coeficiente numérico
$f$	frequência de curvas ( $s^{-1}$ )
$F$	caudal volumétrico ou taxa de fluxo ( $m^3/s$ )
$h$	raio do capilar(m)
$H$	altura do prato da coluna (m)
$H$	espessura do leito (m)
$K$	coeficiente de Carman - Kozeny
$K$	condutividade hidráulica (m/d)
$k$	constante de Boltzmann
$k$	coeficiente de permeabilidade do meio ( $m^2$ )
$k$	coeficiente de filtração
$k'$	factor de capacidade de um dado componente
$K_0$	factor de forma de Carman - Kozeny
$K_d$	coeficiente de distribuição ou partição
$l$	comprimento da fibra (m)
$L$	altura do empacotamento (m)
$L$	profundidade (m)
$L_e$	comprimento realmente atravessado pelo fluido através do meio (m)
$M$	peso molecular do polímero (g/mol)
$N$	número de pratos da coluna
$n_b$	número de curvas

$N_c$	número de coordenação ou pontos de contacto
$\overline{N_c}$	número médio de coordenação ou pontos de contacto
$por$	número de poros (ou segmentos) ocupados pela cadeia de DNA
$r$	razão de aspecto da fibra
$r$	raio equivalente de Stokes – Einstein da molécula
$R$	constante universal (Pa.m <sup>3</sup> /(mol K))
$R$	coeficiente de retenção
$r_c$	raio de canal efectivo (m)
$r_{eff}$	raio efectivo da macromolécula (m)
$r_{Flory}$	raiz média quadrada da distância de uma ponta à outra da cadeia ou do raio de Flory (m)
$r_g$	raio de giração (m)
$r_H$	raio hidrodinâmico (m)
$r_{por}$	raio do poro (m)
$R_s$	resolução
$S$	selectividade
$S$	raio de rotação do polímero em equilíbrio (m)
$S$	área específica da superfície da partícula (m)
$t_0$	tempo do início da retenção (s)
$T^0$	temperatura absoluta (K)
$t_m$	tempo de migração do polímero (s)
$t_r$	tempo de eluição do pico após a injeção (s)
$t_w$	largura da base do pico em unidades de tempo (s)
$u$	velocidade do fluido (m/s)
$u_{ap}$	velocidade aparente do fluido (m/s)
$u_f$	velocidades do fluido (m/s)
$u_p$	velocidades da partícula (m/s)
$V_e$	volume de poros (m <sup>3</sup> )
$V_m$	volume de espaços vazios medido pelo tempo de retenção de um componente excluído (m <sup>3</sup> )
$V_r$	volume de retenção do pico do soluto (m <sup>3</sup> )
$V_T$	volume de empacotamento (m <sup>3</sup> )
$w$	velocidade real do fluido (m/s)
$x_D$	fracção mássica ou volúmica de partículas esféricas de maior dimensão
$x_d$	fracção mássica ou volúmica de partículas esféricas de menor dimensão
$x_{Dmin}$	fracção mássica ou volúmica de partículas esféricas de maior dimensão onde se regista o mínimo da porosidade
$\mu$	viscosidade do fluido (Pa.s)
$\mu_s$	viscosidade do solvente (Pa.s)
$\mu_0$	viscosidade limite à velocidade de corte zero (Pa.s)
$\phi$	parâmetro de correcção da porosidade
$\beta$	parâmetro de correcção da porosidade
$\beta$	parâmetro de correcção da porosidade
$\delta$	razão de diâmetro entre partículas de menor dimensão e partículas de maior dimensão, em misturas binárias
$\delta_c$	rácio crítico, de diâmetro de partículas esféricas

$\varepsilon$	porosidade
$\varepsilon_D^0$	porosidade de um leito monocomponente de partículas esféricas de maior dimensão
$\varepsilon_d^0$	porosidade de um leito monocomponente de partículas esféricas de menor dimensão
$\varepsilon_{min}$	porosidade mínima
$\tau$	tortuosidade
$\tau$	factor de retenção do polímero
$\tau$	tempo de retenção relativo
$\tau'$	valor de $\tau$ para o valor de velocidade mais baixo da fase móvel
$\tau_0$	tortuosidade dos componentes puros
$\tau_D$	macro - tortuosidade
$\tau_d$	micro - tortuosidade
$\tau_M$	intermédio tortuosidade
$\Delta P$	queda de pressão através do meio (Pa)
$\theta$	tempo de relaxamento do polímero (s)
$\theta_p$	tempo quando a molécula do polímero fica exposta à deformação (s)
$\lambda$	razão do tamanho da molécula com o tamanho do poro
$\lambda$	tamanho relativo da molécula de polímero
$\lambda_p$	razão do tamanho da molécula com o tamanho da partícula
$v$	velocidade da fase móvel ou velocidade linear do solvente (m/s)
$\rho$	massa específica (kg/m <sup>3</sup> )
$\sigma_v$	desvio padrão de um pico de Gauss
$\sigma_f^2$	variância da gama de $\ln K$
$\delta^2$	variância da gama de $\ln .K$ (condutividade hidráulica)
$v$	velocidade reduzida (m/s)
$\Phi$	parâmetro de Flory-Fox = $2.5 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$
$\varphi$	resistência do leito presente numa coluna
$\psi$	constante empírica
$\dot{\Gamma}$	taxa de alongamento (m <sup>-1</sup> )